

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/010140 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 31/00, 37/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009142
- (22) 国際出願日: 2003 年 7 月 18 日 (18.07.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-211462 2002 年 7 月 19 日 (19.07.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千代田区霞ヶ関一丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山下 健一 (YAMASHITA, Kenichi) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖

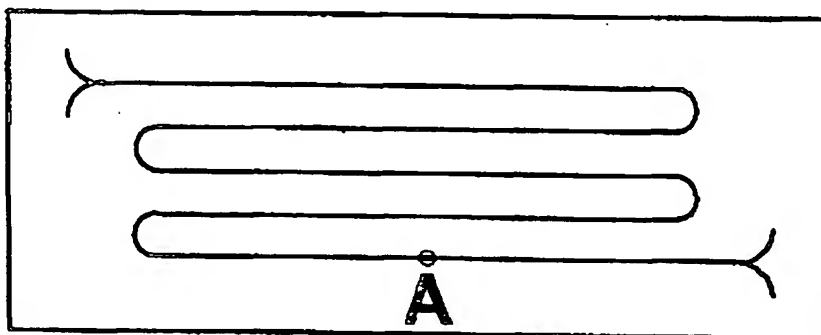
市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP). 前田 英明 (MAEDA, Hideaki) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP). 清水 肇 (SHIMIZU, Hajime) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP). 宮崎 真佐也 (MIYAZAKI, Masaya) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP). 中村 浩之 (NAKAMURA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP). 山口 佳子 (YAMAGUCHI, Yoshiko) [JP/JP]; 〒841-0052 佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内 Saga (JP).

- (74) 代理人: 阿形 明, 外 (AGATA, Akira et al.); 〒105-0004 東京都港区新橋二丁目12-5 池伝ビル3階 阿形特許事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: MOLECULE ANALYZING METHOD USING MICROCHANNEL

(54) 発明の名称: マイクロ流路を利用することによる分子分析方法



(57) Abstract: A novel method for analyzing a specimen molecule with high accuracy through a simple operation by forming a laminar flow of a specimen molecule containing solution and a complex forming molecule containing solution in a microchannel and measuring the variation of the degree of diffusion of complexes each composed of a specimen molecule and a complex forming molecule in the laminar flow. The complex forming molecule is fluorescent, and the variation of the degree of diffusion of the formed complexes is measured from the distribution of intensity of fluorescence. The degree of diffusion of the formed complexes can be quantitatively determined by comparing it with a calibration curve preliminarily defined.

(57) 要約: 操作が簡単で、より高い精度が得られる新規な検体分子の分析方法として、検体分子含有溶液と複合体形成用分子含有溶液とを層流を形成させながらマイクロ流路に流し、層流中における検体分子と複合体形成用分子との間で形成される複合体の拡散度の変化を検出し、解析する分析方法を提供する。この方法において複合体形成用分子として、蛍光性を有する分子を用い、蛍光の強度分布により形成された複合体の拡散度の変化を検知する。形成された複合体の拡散度はあらかじめ作成された検量線と対比することにより定量される。



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 補正書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

マイクロ流路を利用することによる分子分析方法

5 技術分野

本発明は、マイクロ流路システムを利用して特定分子の定性又は定量分析を行う方法に関するものである。

背景技術

- 10 遺伝子分野の研究においては、ヒトゲノムの配列解読がほぼ終了し、その成果を基に遺伝子発現、突然変異、一塩基多型などに係わる遺伝子の特定やその機能解析、さらにそれに伴うタンパク質の構造や機能の解析に研究の中心が移りつつある。

- 他方において、これら一連の研究成果を利用して、医療面、福祉面に
15 役立たせるための技術開発も進められている。

- ところで、このような研究に関連して開発された手法の1つに、生体分子のような検体分子をそれと複合体を形成する分子（以下プローブ分子という）との間の相互作用を利用して検出する方法がある。この方法は、固相担体上に固定されたプローブ分子が生体分子と特異的な相互作用により形成する複合体を、あらかじめラベルしておいた蛍光物質や電気化学活性物質の発する信号により検出して生体分子の存在を定性的に
20 検知したり、その定量を行うものである。

- そして、この際の生体物質の検出方法としては、これまでに例えば、電気化学反応を利用する方法 [「アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.)」, 第72巻, 第1334~1341ページ (2000)]、水晶振動子を利用する
25 方法 [「ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (J. Am. Chem. Soc.)」, 第114巻, 第8299~8300ページ (1992)]、表面プラズモン共鳴を利用する方法 (シュプリンガー・フェアラーク東京株

式会社，1998年発行，永田，半田共著，「生体物質相互作用のリアルタイム解析実験法」）などが知られている。

これらは、いずれも金表面に核酸断片やタンパク質などをプローブ分子として固定し、それと特異的な相互作用をもつ生体物質又はその関連物質を結合させ、その際に生じる電気化学的応答、水晶振動子の振動数変化、表面プラズモンによる屈折率変化を検知し、分析するものである。

しかしながら、これらの方法において高い精度で定量分析を行うには、固相担体上に固定するプローブ分子の厳密な制御が必要とされるが、固相担体上へのプローブ分子の固定効率の不均一性、低再現性、固液界面での物質拡散挙動の複雑性及び検体分子を作用させる際の作業者の熟練度の不足などにより、限界を生じるのを避けられなかった。

その他、プローブ分子又は検体分子のいずれも固相担体に固定する必要のない手法もいくつか知られている。このような方法としては、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を利用する方法 [「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）」，第94巻，第10756ページ（1997）]、モレキュラービーコンを利用する方法 [「アナリティカル・ケミストリー（Anal. Chem.）」，第72巻，第747A～753Aページ（2000）] などがある。

しかしながら、PCR反応を利用する方法は、そのPCR反応自体が指数関数的に増幅される反応であるため、精度の高い定量を行うことは原理的にむずかしい。

また、モレキュラービーコンを利用する方法、すなわち蛍光部位と消光部位をプローブDNAの両末端に導入したものは、被検分子との複合体形成前は、自己相補配列をとるために折れ曲がって蛍光が消光するが、複合体形成後はプローブ分子により発光する性質を有することを利用して分析する方法である。

しかしながら、この方法を行うには、プローブDNAの配列設計に制

限がある上に、DNAやその他の核酸の分析にしか適用できないという欠点がある。

発明の開示

5 本発明は、このような事情のもとで、従来の固相担体に検体分子又はプローブ分子を固定して分析する方法がもつ欠点を克服し、操作が簡単で、より高い精度が得られる新規な検体分子、例えば生体物質の分析方法を提供することを目的としてなされたものである。

本発明者らは、プローブ分子と検体分子との複合化を利用して、検体
10 分子の定性、定量分析を行う方法について鋭意研究を重ねた結果、プローブ分子含有溶液と検体分子含有溶液とをマイクロ流路に流した場合、その両者が層流を形成し、たがいに混ざり合わない性質を有すること、したがって、両者の選択的相互作用の強弱によって、拡散度の差異を検出することにより固相担体への固定なしに、しかも高い精度で生体分子
15 のような検体分子を分析しうることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

すなわち、本発明は、検体分子含有溶液と複合体形成用分子含有溶液とを層流を形成させながらマイクロ流路に流し、層流中における検体分子と複合体形成用分子との間で形成される複合体の拡散度の変化を検出
20 し、解析することを特徴とする分析方法、この方法において複合体形成用分子として、蛍光性を有する分子を用い、蛍光度の強弱により形成された複合体の拡散度の変化を検知する方法、及び形成された複合体の拡散度をあらかじめ形成された検量線と対比することにより検体分子の濃度を定量する方法を提供するものである。

25

図面の簡単な説明

図1は、本発明方法で用いるマイクロ流路の1例を示す平面図である。

図2は、実施例1の結果を示す棒グラフである。

図3は、実施例2におけるプローブDNA濃度とその蛍光強度との関係を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明方法は、マイクロ流路にプローブ分子含有溶液と検体分子含有溶液とを層流を形成させながら同時に流し、流れる間に両者の間の特異的相互作用により形成される複合体の各層流への拡散度が、その複合化の強弱によって変化するのを、プローブ分子の発する信号により検知し、
10 その結果を解析することにより検体の分析を行うものである。

本発明方法で用いるマイクロ流路は、不活性材料からなる基板上に設けられていることが必要である。この不活性材料とは、プローブ分子や検体分子や使用される溶媒及び生成する複合体に対し、反応性を示さない材料のことであり、例えばガラス、石英、又はシリカ、 Si/SiO_2 、マ
15 グネシア、ジルコニア、アルミナ、アパタイト、窒化ケイ素、及びチタン、アルミニウム、イットリウム、タングステンなどの金属の酸化物、炭化物、窒化物、ホウ化物、ケイ化物などのセラミックスを挙げることができる。

このほか上記の要件を満たすものである限り、金属、プラスチックなども用いることができる。このベースの形状としては、板状体が普通であるが、所望ならば弧状体、球体、粒体などのものを用いることができる。

これらの材料は、選択する手段、検体及びプローブ分子の種類、溶媒に応じて適宜選択されるが、光学的手段で検出する場合は、検出部位に
25 においては使用する光の波長に対し、十分な透明性を示すものを用いる必要がある。

本発明におけるマイクロ流路は、これらの不活性材料からなる基板に、幅10～500 μm 、好ましくは50～400 μm 、深さ10～500 μm 、

好ましくは50～400 μ mのサイズで刻設される。このマイクロ流路の長さには特に制限はなく、使用される不活性材料基板のサイズに依存するが、通常100～300mmの範囲で選ばれる。

このようなマイクロ流路は、例えばマイクロドリルのような工作機械
5 を用いる機械的手段により基板上に刻設するか、あるいは半導体集積回路製造などに用いられる光リソグラフィー技術により溝を形成させた後、別の基板を接着することにより製造することができる。このような極細の流路を流れる流体は、たがいに可溶な溶媒であっても混ざり合うことなく、層流を形成したまま流れていく。また、このような極細の流路は、
10 物質の拡散距離が短いという特徴を有している。

一般にマイクロ流路を流れる2液の界面では、溶質は、溶媒に可溶であれば、もう一方の溶液のほうへ自然に拡散していくが、プローブ分子と検体分子との間に特別な相互作用がある場合には、それらの複合体の拡散をさらに加速させることができる。

15 本発明方法は、この現象を利用した分析方法を提供するものであって、プローブ分子に導入した官能基の発する信号、もしくはプローブ分子自体の持つ特異的な特性（特定波長の光の吸収など）、もしくは形成された複合体に選択的に結合する物質の発する信号や特性を検出することで、自然拡散に上乗せされた余分の拡散量を知ることができ、その量により、
20 検体の分析を行うものである。

したがって、本発明方法は、プローブ分子と検体分子との間に特異的な相互作用が生じるような場合において、一般的に利用することができる。例えば、プローブとして核酸断片を用いれば、特異的配列を持つ核酸断片の検出や分析に用いることができる。例えばプローブとしてタン
25 パク質を用いる場合には、特定の抗体を検出することができる。プロテアーゼ阻害活性を有する各種ペプチドをプローブとして用いた場合には、特定の酵素の検出やその活性の評価を行うことができる。各種糖をプローブとして用いた場合には、それを特異的に認識する核酸やタンパク質

を検出、定量することができる。各種細胞をプローブとして用いた場合には、種々の天然又は人工薬剤、環境物質などの生体への影響をスクリーニングすることができる。

5 本発明方法では、これらに限らず、プローブ分子と検体分子との間に特異的相互作用を生じるような組合せを選択すれば、あらゆる化合物の検出に利用することができる。また、上記の例では、化学的な意味での単一分子が用いられているが、これ以外にも細胞などやその他の物質一般への展開が可能である。

10 本発明方法におけるプローブ分子と検体分子との間の複合体形成については、従来の方法のように作業者の熟練を必要とすることはない。

本発明方法では、プローブ分子と検体分子の複合体形成に関しても、作業者の熟練度の差による分析結果の不確実性を排除することができる。従来法では、例えば核酸断片検出の際のハイブリダイゼーション操作のような、プローブ分子と検体分子の複合体形成のための実験操作が必要
15 となり、この実験操作における作業者の熟練度の差によってもたらされる分析結果の不確実性が問題となっていた。

これに対し、本発明方法では、注射器などで溶液を流路内に流し込むだけであるため、熟練度は無関係であり、シリンジポンプなどの器具を用いれば、さらに作業者の熟練度の差を排することができる。

20 さらに、本発明方法においては、プローブ分子の分子数が少なくても、微小空間内で処理が行われるため、その濃度を高く保つことができ、プローブ分子の発する特異的な信号の密度を高めることができる。したがって、本発明方法によれば、高感度の検出を行うことができる。

本発明方法における検出に要する時間は、送液した溶液が流路を流れるのに要する時間であるが、数百 μm 程度の大きさの極細の流路を流れるのに要する時間は、たとえその送液量が少なくとも流路の体積も小さいため、本発明方法における検出に要する時間は当然短くなる。この時間は、使用するマイクロ流路の寸法などに左右されるが、通常数秒以内

である。

本発明方法は、層流中における検体分子とプローブ分子との間で形成される複合体の拡散度の変化に基づいて検体分子の定性的又は定量的な分析を行うものである。すなわち、検体分子とプローブ分子との間に親和性がない場合には、両者は単に通常の混合挙動に基づく層流間の拡散度5が検出されるだけであるが、両者の間で親和性を有する場合には、形成された複合体を選択的に拡散促進させることができ、増大された拡散度として検出される。したがって、このような拡散度の違いを対比することによって、プローブ分子に対する検体分子の作用を定性的に知ることが可能である。10

上記の検出は、測定しやすいということから、通常検体分子溶液側へ拡散するプローブ分子の量を直接測定するか、あるいはプローブ分子溶液側のプローブ分子の量を測定することにより行われる。この測定は、プローブ分子に付した特徴的な信号をセンサーで検出することにより行15われるが、特にプローブ分子として蛍光性官能基を導入して蛍光性を付与した分子を用い、その蛍光の強度を追跡して生成する複合体の拡散度の変化を求めるのが有利である。

そのほか、プローブ分子として、電気化学活性官能基を導入した分子を用い、その電流の変化を求める方法や、プローブ分子のもつ特異的な紫外光、可視光又は赤外光に対する吸収強度を測定する方法なども利用20可能である。

このようにして、プローブ分子に特異的な信号を得るための化学修飾を施すことなく、検体分子の分析を行うことができる。

また、複合体の拡散度の測定に先立って、あらかじめ知られた量について検量線を作成しておき、次いで検出結果をこれと対比すれば検体分子の濃度の定量をすることもできる。25

以上は、検体分子溶液側へ拡散したプローブ分子の量を測定する場合であるが、所望ならばプローブ分子溶液側へ拡散した検体分子とプロー

ブ分子との複合体を測定して、検体分子の量を検出することもできる。

このように、本発明方法における検出手段には、特に制限はなく、プローブ分子と検体分子との複合体の拡散状況が分かる手段であればどのような手段でもよい。

- 5 次に、本発明方法において、マイクロ流路に溶液を送液するには、例えば注射器を接続し、手動で行うことも可能であるが、シリンジポンプなどの機械的手段により送液速度、送液圧力などを制御しながら行うのが有利である。

- 10 例えば、マイクロ流路に検体分子溶液とプローブ分子溶液を同時に送液し、ある一定距離流路を通過した後、検出操作を行う。ここでは、検体分子溶液とプローブ分子溶液とは少なくとも1種類ずつ必要であるが、複数の溶液を同時に流すことにより、性質の異なる情報を同時に得ることも可能である。この際の検出は、例えば蛍光法で行う場合、検出部位にレーザー光又はその他の励起光源からの光を照射し、そこから発せら
- 15 れる蛍光の強度を測定する。検体溶液側から出る蛍光が強いほどプローブ分子の存在量が多いということであり、すなわちプローブ分子と検体との相互作用の強さに反映される。このようにして、目的の検体の有無や存在量を知ることができる。

- 20 次に、所定の配列のDNAの検出を蛍光性官能基を導入したプローブ分子を用いて行った場合を例として、具体的に説明する。

- すなわち、検体DNA断片溶液と、プローブである蛍光性官能基導入DNA断片溶液を、マイクロ流路に送液する。ある一定距離流路を流れた後、サンプル溶液側にレーザー光などの励起光を照射する。そこから発せられる蛍光がないか弱ければ、プローブDNA断片と検体DNA断片の配列相補性はないものと判断される。逆にそこで検出される蛍光が強ければ、プローブDNA断片と検体DNA断片の配列相補性があると判断される。
- 25

この際、未知試料を検定する前に、既知試料について蛍光強度と相補

性の度合いを調べておくことでより正確に分析することができると同時に、相補配列を持つDNA断片の量を定量することができる。

この場合、プローブ分子としてのDNAに代えて、DNA結合性ペプチド（DNAに類似した構造を持つペプチドで、DNAよりも配列認識能が高い）又はLNA（DNAのリボース環2'位と5'位を連結したもので配列認識能が高い）を使用することにより、さらに精度の高い分析を行うことが可能となる。また、PNAはDNAとは異なり、有機溶媒にも可溶であり、検体を水溶液とし、プローブPNAを有機溶媒に溶かして使用することにより、検体のプローブ溶液側への拡散を抑えることができ、さらに精度の高い分析を行うことが可能となる。

次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によりなんら限定されるものではない。

なお、マイクロ流路としては、図1に示すように、横70mm、縦30mmの亚克力樹脂板に、幅360 μ m、深さ200 μ mのチャンネルをマイクロドリルにより刻設したものをを用いた。

実施例1

プローブDNAとして、構造式F-(5')-AGGCTGCTCCCCGCGTGGCC-(3')（ただしFはフルオレセイン）で表わされる5'末端に蛍光物質のフルオロセインを導入したDNA断片を調製した。

また、試料DNAとして、構造式(5')-GGCCACGCGGGGAGCAGCCT-(3')（以下、試料1と称する）及び構造式(5')-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-(3')（以下、試料2と称する）で表わされる2種類のDNA断片を準備した。

これら3種のDNA断片の溶液とともにDNA断片を含まない溶液（以下、ブランク溶液と称する）の、計4種類の溶液を調製した。溶液は、1 pmol/ μ lのDNA、5 mMリン酸緩衝液（pH7.0）、50 mM塩化ナトリウムの溶液組成である。

これらのプローブDNA溶液と試料1溶液、プローブDNA溶液と試料2溶液、プローブDNA溶液とブランク溶液の、3つの組合せをマイクロ流路に送液速度20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で送液した。

次に、図1中のAの場所における検体流路側にアルゴンガスレーザーの発する488nmの光を照射することにより蛍光を発生させ、その強度を比較した。その結果を棒グラフとして図2に示す。このグラフは、10回測定した蛍光強度（任意単位）の平均値であり、標準偏差の範囲をエラーバーにて示した。プローブDNA断片と相補的な塩基配列のサンプル1の場合のみ、ほかの2つの比較対照の場合よりも特に大きな蛍光応答を得た。この結果から、特別な相互作用を持つ分子が、その相互作用によって拡散が加速されることを利用して、分析可能であることが分る。その測定結果は、変動係数にして3%程度であり、極めて高い再現性を示していた。

15 実施例2

プローブDNA溶液として、構造式F-(5')-AGGCTGCTCCCCGCGTGGCC-(3')（ただしFはフルオレセイン）で表わされる5'末端にフルオレセインを導入したDNA断片を、1 pmol/ μl 、500 fmol/ μl 、300 fmol/ μl 、100 fmol/ μl 、50 fmol/ μl 、30 fmol/ μl 、10 fmol/ μl 、5 fmol/ μl 、3 fmol/ μl 、1 fmol/ μl の濃度を含有する10種類の5 mMリン酸緩衝液（pH7.0）と50 mM塩化ナトリウム水溶液との混合液を調製した。

別にDNA断片を含まない5 mMリン酸緩衝液（pH7.0）と50 mM塩化ナトリウム水溶液との混合液を調製した。

これらの溶液試料を図1に示す形状のマイクロ流路にシリンジポンプにより送液速度20 $\mu\text{l}/\text{min}$ で送液した。

次いで、図1中のAの場所におけるプローブDNA流路側にアルゴンガスレーザーの発する波長488nmの光を照射することにより蛍光を生

じさせ、その強度とプローブDNA濃度の関係を求めた。その結果をグラフとして図3に示す。図3は、10回測定した蛍光強度（相対値）の平均値とプローブDNA濃度との関係を示したものである。

- 次に、レーザー光の照射される溶液の実体積と溶液の濃度からプローブDNAの絶対量を計算し、下列に併記した。プローブDNAの濃度、すなわちプローブDNAの存在量の増加にしたがって、得られた蛍光強度も強くなっており、両変数の間には高い相関性が認められた。その検出下限は、流路の設計その他により異なるが、本実施例においては10amol程度であった。

10

産業上の利用可能性

- 本発明によると、固相担体に固定することなしに、単にプローブ含有溶液と検体含有溶液を層流としてマイクロ流路に送液し、所定の位置でプローブ分子と検体分子との複合体の濃度として検出される拡散度を測定するだけで、高い精度により検体の定性及び定量分析を行うことができる。しかも、本発明方法は単純な操作で行われるため、作業者の熟練度の差による分析結果の誤差を最小限に抑制することができる上、適用しうる検体の分子種に制限がなく、広い範囲に応用することができるという利点がある。

20

請 求 の 範 囲

1. 検体分子を含有する溶液と、検体分子との間に複合体を形成し得るプローブ分子を含有する溶液とを層流が形成されるようにマイクロ流路に流す工程と、層流中における、検体分子とプローブ分子との間に形成された複合体の拡散度を検出し、解析する工程を包含する検体分子の分析方法。
2. 前記プローブ分子が蛍光を発生し得る分子である請求項1に記載の分析方法。
3. 前記複合体の拡散度の検出及び解析をあらかじめ作成された検量線と対比することにより行われる請求項1に記載の分析方法。
4. 特定配列のDNA断片を検体分子として含有する溶液と、検体分子との間に複合体を形成し得るプローブ分子を含有する溶液とを層流が形成されるようにマイクロ流路に流す工程と、層流中における、検体分子とプローブ分子との間に形成された複合体の拡散度を検出し、解析する工程を包含するDNA断片の分析方法。

補正書の請求の範囲

[2003年11月3日(03.11.03)国際事務局受理：出願当初の請求の範囲
1及び4は補正された；他の請求の範囲は変更なし。(1頁)]

1. (補正後) 検体分子を含有する溶液と、検体分子との間に複合体を形成し得るプローブ分子を含有する溶液とを層流が形成されるように
- 5 マイクロ流路に流す工程、親和性に基づいて形成された複合体を選択的に拡散促進させる工程及び層流中における、検体分子とプローブ分子との間に形成された複合体の拡散度を検出し、解析する工程を包含する検体分子の分析方法。
- 10 2. 前記プローブ分子が蛍光を発生し得る分子である請求項1に記載の分析方法。
3. 前記複合体の拡散度の検出及び解析をあらかじめ作成された検量線と対比することにより行われる請求項1に記載の分析方法。
- 15 4. (補正後) 特定配列のDNA断片を検体分子として含有する溶液と、検体分子との間に複合体を形成し得るプローブ分子を含有する溶液とを層流が形成されるようにマイクロ流路に流す工程、親和性に基づいて形成された複合体を選択的に拡散促進させる工程及び層流中における、検
- 20 体分子とプローブ分子との間に形成された複合体の拡散度を検出し、解析する工程を包含するDNA断片の分析方法。

図 1

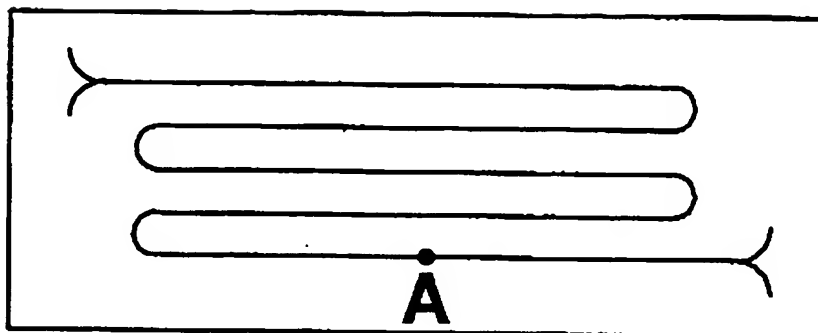
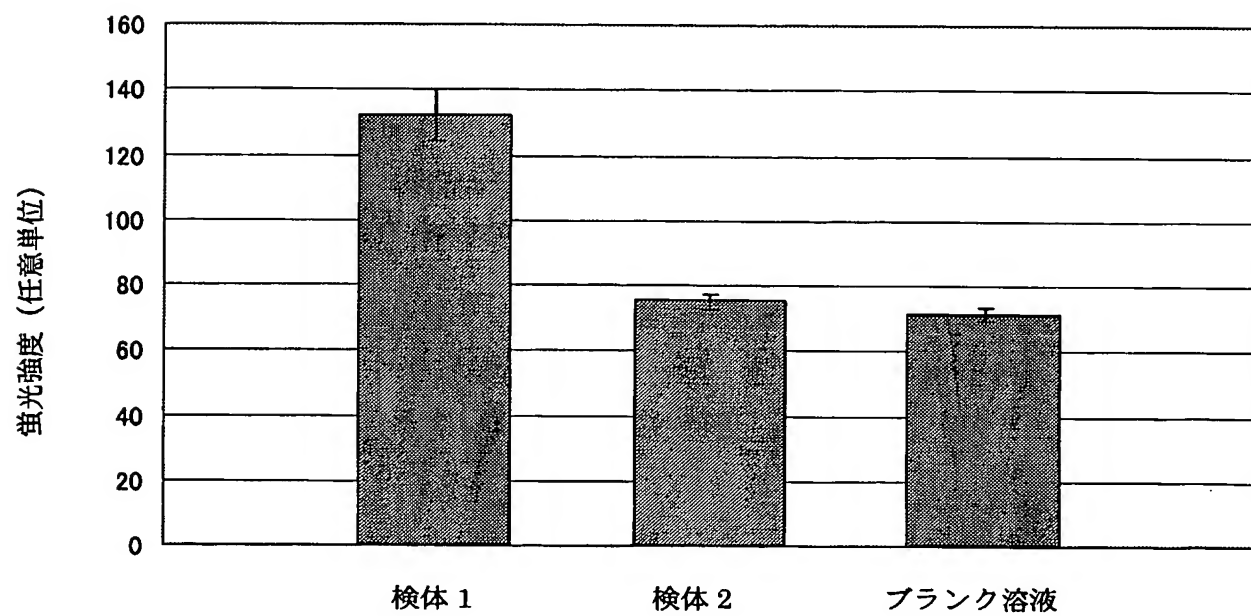
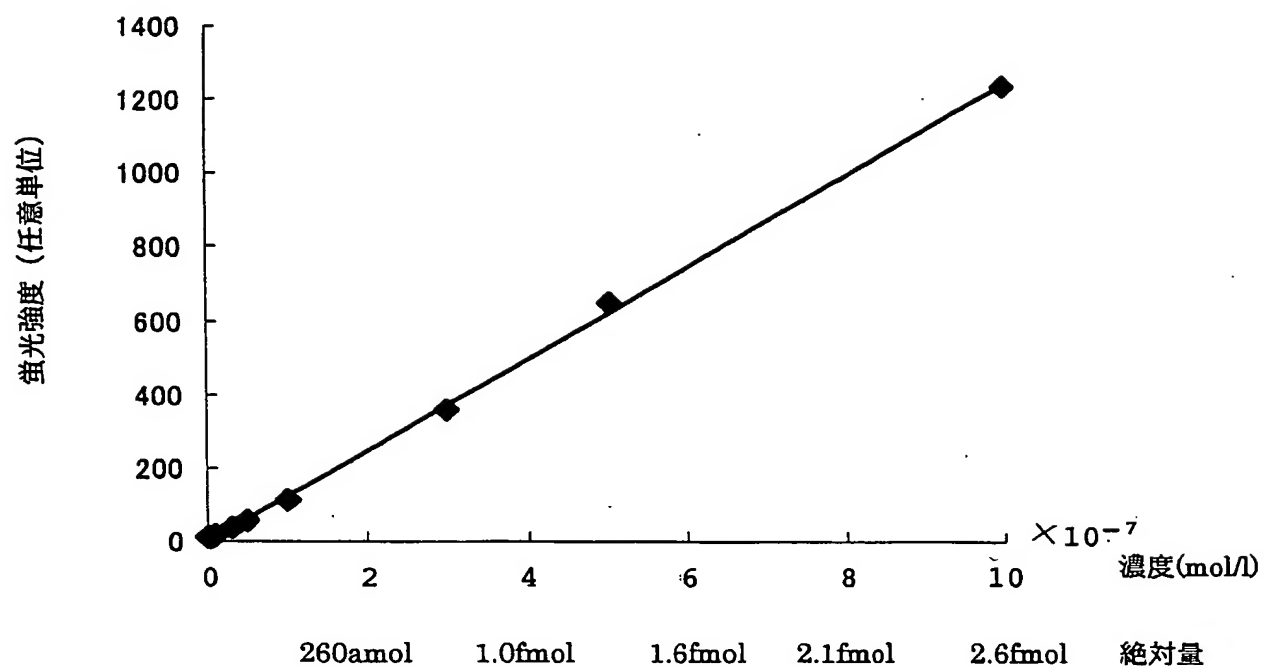


図 2



2 / 2

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09142

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N31/20, G01N37/00 | | |
|---|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ G01N33/53, G01N31/20, G01N37/00 | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003 | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 00/22434 A (ZENECA LTD.), 20 April, 2000 (20.04.00), & AU 9961151 A & EP 1121595 A & JP 2002-527750 A | 1-4 |
| X | JP 2001-518624 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON), 16 October, 2001 (16.10.01) & WO 99/17119 A & EP 1018012 A & US 6221677 B | 1, 2 |
| A | WO 00/072020 A (UNIVERSITY OF WASHINGTON), 30 November, 2000 (30.11.00) & AU 200138840 A & EP 1179181 A & US 2002/0090644 A & JP 2003-500653 A | 1-4 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 11 August, 2003 (11.08.03) | | Date of mailing of the international search report 26 August, 2003 (26.08.03) |
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | | Authorized officer |
| Facsimile No. | | Telephone No. |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 31/20 G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N 33/53 G01N 31/20 G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | WO 00/22434 A(ZENECA LIMITED)2000.04.20 & AU 9961151 A & EP 1121595 A & JP 2002-527750 A | 1-4 |
| X | JP 2001-518624 A(ユニバーシティ・オブ・ワシントン)2001.10.16 & WO 99/17119 A & EP 1018012 A & US 6221677 B | 1, 2 |
| A | WO 00/072020 A(UNIVERSITY OF WASHINGTON)2000.11.30 & AU 200138840 A & EP 1179181 A & US 2002/0090644 A & JP 2003-500653 A | 1-4 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.08.03

国際調査報告の発送日

26.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251